

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Bab ini membahas mengenai waktu dan lokasi penelitian, alat dan bahan, prosedur penelitian, bagan alir penelitian, dan metodologi penelitian yang meliputi, proses perkecambahan, ekstraksi, dan analisis dengan HPLC/UV dan UPLC-ESI-QTOF.

#### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus dengan tempat dan kegiatan sebagai berikut:

- 1) Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan perkecambahan dan elisitasi sampel serta ekstraksi sampel.
- 2) Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI untuk melakukan uji sampel dengan alat HPLC/UV (*High Performance Liquid Chromatography/ Ultraviolet*).
- 3) Laboratorium Sentral UNPAD untuk melakukan uji sampel dengan alat UPLC-ESI-QTOF (*Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray ionization- Quadrupole-Time of Flight*).

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (gelas kimia 500 ml, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 50 ml, gelas ukur 100 ml, kaca arloji, pipet, labu ukur 10 ml, corong kaca, batang pengaduk, labu erlenmeyer 100 ml, dan desikator) mikropipet, spatula, kertas saring, tabung *centrifuge*, neraca analitik Metler Toledo, alat perkecambahan berupa *germinator* yang dilengkapi dengan *heating mat* 12 V (Hyindoor),

Asri Ardiantika, 2019

PENGARUH PERKECAMBAHAN DAN KOMBINASI PERKECAMBAHAN-ELISITASI MENGGUNAKAN JAMUR TEMPE TERHADAP PROFIL ASAM AMINO NON PORTEIN PADA KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | [repository.upi.edu](https://repository.upi.edu) | [perpustakaan.upi.edu](https://perpustakaan.upi.edu)

*humidifier* DC 24 V, *mini fan* DC 12V, lampu UV 15 W (Yang), oven, kain tile, *tray* plastik.

Untuk proses ekstraksi dan analisis ekstrak digunakan beberapa alat yaitu *ball miller High Energy Milling-Ellipse 3D Motion* (HEM-E3D) (Nanotech Herbal, Indonesia), *ultrasonic cleaner* (Labocon, UK), *centrifuge* (Kokusan H-103n, Japan), *rotary vacuum evaporator* (Buchi R-3, Switzerland), *vortex* SciLogex MX-S, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Hitachi dan *Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray ionization- Quadrupole-Time of Flight* (UPLC-ESI-QTOF).

### 3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan yaitu koro pedang yang diperoleh secara komersil dari Purworejo, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan yaitu ragi tempe (LIPI), air mineral, aquades, aquabides pro injeksi (Ikapharmindo Putramas, Indonesia), larutan natrium hipoklorit 1% (Johnson Home Hygiene Products, Indonesia), metanol grade p.a (Merck, Jerman), n-heksan grade p.a (Merck, Jerman).

### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu :

1. Tahap pembersihan sampel  
Koro pedang dicuci dengan air mengalir
2. Tahap preparasi suspensi spora  
Bubuk jamur tempe sebanyak 1 gram dilarutkan dengan aquabides 15 mL.
3. Tahap perkecambahan  
Dilakukan terlebih dahulu proses sterilisasi menggunakan larutan hipokolit 1% selama 30 menit dan perendaman selama 6 jam pada suhu 40°C. Perkecambahan dilakukan dalam alat germinator selama 7 hari dengan kelembaban 100% untuk koro pedang yang dikecambahkan

Asri Ardiantika, 2019

PENGARUH PERKECAMBAHAN DAN KOMBINASI PERKECAMBAHAN-ELISITASI MENGGUNAKAN JAMUR TEMPE TERHADAP PROFIL ASAM AMINO NON PORTEIN PADA KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

(G), dan 2 hari untuk koro pedang yang dikecambahkan dan dielisitasi (EG).

4. Tahap inokulasi

Suspensi spora ditambahkan ke koro pedang yang telah dikecambahkan selama 2 hari (EG), dan diinkubasi selama 5 hari.

5. Tahap pengeringan

Setiap sampel dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 12 jam, kemudian digiling dengan menggunakan *ball miller* dan disaring dengan ukuran 100 mesh.

6. Tahap ekstraksi

Bubuk koro pedang diekstraksi menggunakan *ultrasonic vibrator*. Bubuk koro pedang dihilangkan lemaknya menggunakan n-heksan setelah itu diekstrak menggunakan pelarut metanol:air (1:1). Kemudian ekstrak disentrifugasi dan disaring. Filtrat kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak kering dilarutkan kembali sampai volume 10 mL. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pada satu sampel.

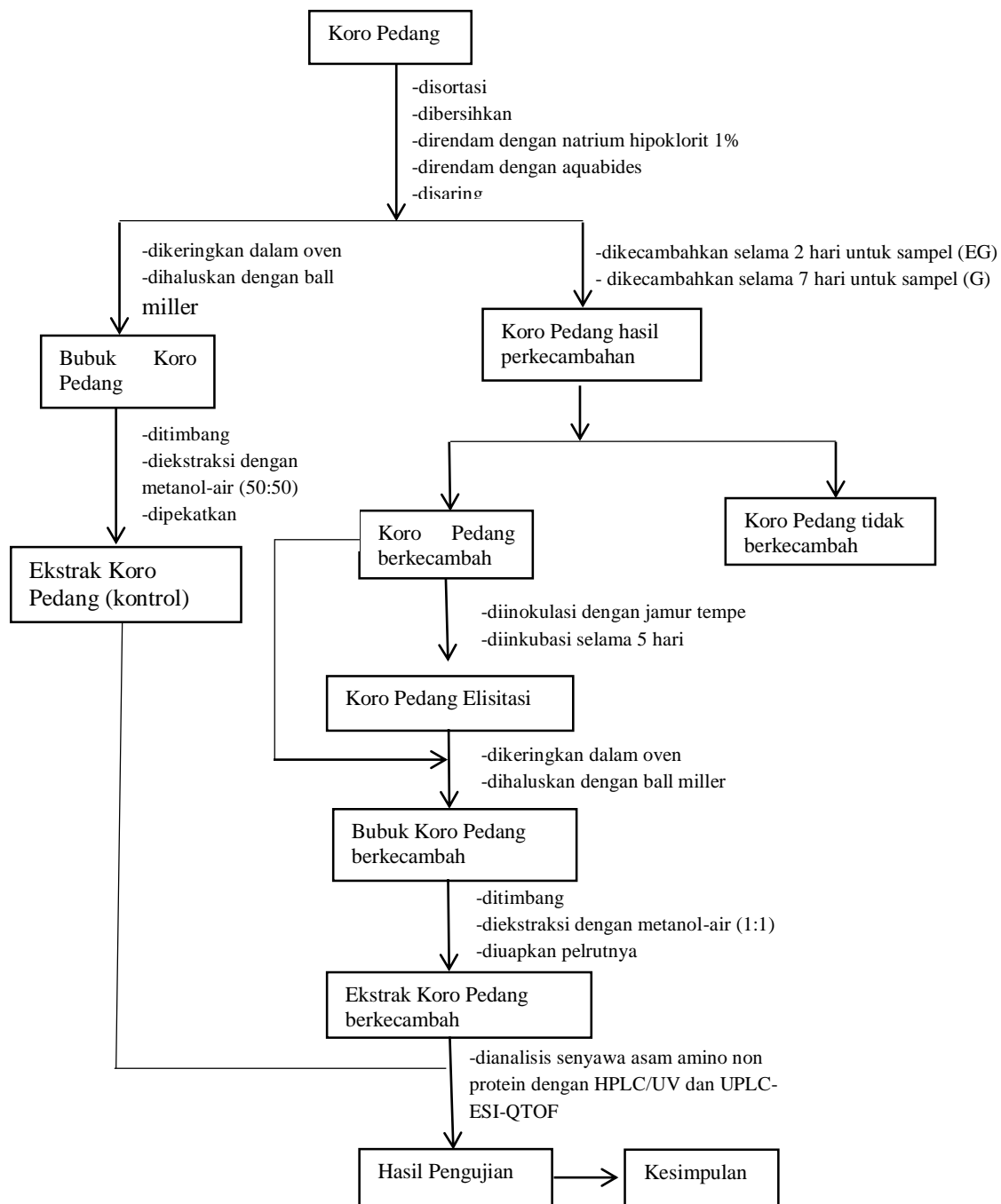
7. Tahap analisis dengan HPLC/UV

Analisis dilakukan dengan menggunakan HPLC/UV Hitachi D-7000 dengan kolom fasa terbalik C-18. Hal ini bertujuan untuk mengetahui profil asam amino non protein ekstrak koro pedang pada panjang gelombang 280 nm.

8. Tahap analisis dengan UPLC-ESI-QTOF

Analisis dilakukan dengan menggunakan UPLC-ESI-QTOF. Hal ini bertujuan untuk mengetahui profil asam amino non protein ekstrak koro pedang.

### 3.4 Bagan Alir



**Gambar 3.10** Bagan alir penelitian

Asri Ardiantika, 2019

PENGARUH PERKECAMBAHAN DAN KOMBINASI PERKECAMBAHAN-ELISITASI MENGGUNAKAN JAMUR TEMPE TERHADAP PROFIL ASAM AMINO NON PORTEIN PADA KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Tahap Pembersihan Sampel

Koro pedang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bersal dari Purworejo Jawa Tengah. Koro pedang terlebih dahulu disortasi dengan cara memilih koro pedang yang utuh, tidak terbelah, kulitnya tidak kisut dan terkelupas. Setelah itu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu permukaan.

#### 3.5.2 Tahap Proses Perkecambahan

##### 1. Alat Perkecambahan

Perkecambahan koro pedang dilakukan dalam alat mesin perkecambahan (*germinator*) skala laboratorium yang dibuat dan dioptimasi mengikuti penelitian yang dilakukan oleh Aisyah *et al.* (2013) dengan modifikasi. Faktor yang dikontrol dalam mesin perkecambahan ini adalah kelembaban, suhu, dan intensitas cahaya. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa untuk proses perkecambahan dibutuhkan kelembaban sebesar 99% (Ti *et al.*, 2014). Kontrol kelembaban diatur dengan mengatur waktu nyala *humidifier* dan kipas pada alat perkecambahan dengan mikrotimer. Kondisi optimum untuk perkecambahan diperoleh dengan mengatur *humidifier* dan kipas setiap 3 jam dengan durasi 5 menit sedangkan untuk inkubasi yaitu setiap 5 jam dengan durasi 2 menit. *Humidifier* yang terdapat di dalam wadah air akan menkonversi air menjadi kabut air. Selama *humidifier* menyala, sebuah kipas yang ada di dalam alat bekerja mendistribusikan kabut air ke seluruh area alat perkecambahan. Suhu dalam alat (25-30 °C) dijaga oleh *heat mat* (*Hyindoor* 12 V) disertai termostat yang diletakkan di bawah alat. Sensor termometer dipasangkan di dalam alat perkecambahan untuk mengetahui suhu selama waktu perkecambahan. Untuk menjaga sampel dari cahaya digunakan box germinator berwarna hitam agar tidak ada cahaya yang masuk dari luar. Sebelum digunakan, alat perkecambahan disterilisasi dengan menggunakan lampu UV selama 15 menit, disemprotkan alkohol

70 % dan disemprotkan larutan hipoklorit (NaOCl) 0,07% (v/v) ke seluruh bagian alat lalu didiamkan selama 15 menit.



**Gambar 11** Skema alat perkecambahan

## 2. Proses Suspensi Spora

Bubuk jamur tempe sebanyak 1 g disuspensikan dengan menggunakan aquabides 15 mL untuk memperoleh suspensi spora sebanyak  $1 \times 10^8$  /mL. Kemudian suspensi kultur jamur yang telah disiapkan diinokulasikan pada koro pedang dan dicampur dengan merata (15 mL suspensi jamur diinokulasikan pada 200 g koro pedang) (Feng, Saw, Lee, & Huang, 2007).

## 3. Proses Perkecambahan

Sebelum proses perkecambahan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Aisyah *et al.* (2013) dengan sedikit modifikasi menggunakan larutan natrium hipoklorit 1% (w/v) sebanyak 5 L/kg koro pedang untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme selama perkecambahan. Sterilisasi dengan natrium hipoklorit merangsang perkecambahan hingga hampir 100% (Ervin & Wetzel, 2002). Perendaman dengan larutan natrium hipoklorit 1% ini dilakukan selama 30 menit lalu dibilas dengan aquades. Setelah itu dilakukan perendaman dengan aquabides sebanyak 5L/kg koro pedang

Asri Ardiantika, 2019

PENGARUH PERKECAMBAHAN DAN KOMBINASI PERKECAMBAHAN-ELISITASI MENGGUNAKAN JAMUR TEMPE TERHADAP PROFIL ASAM AMINO NON PORTEIN PADA KORO PEDANG (*Canavalia ensiformis* L.)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

selama 6 jam pada suhu 40°C. Proses perendaman dengan natrium hipoklorit dan aquabides dilakukan di suhu ruang dan di tempat yang terhindar dari cahaya.

Dibuat beberapa sampel untuk setiap perlakuan yang berbeda yaitu koro pedang yang hanya disterilisasi (*untreated*, UT), koro pedang yang disterilisasi dan direndam (*ungerminated*, UG), koro pedang yang dikecambahkan (*germinated*, G) dan koro pedang yang dikecambahkan dengan menggunakan elisitor jamur tempe (*elicited* dan *germinated*, EG). Berikut merupakan kesimpulan perbedaan perlakuan pada koro pedang (Tabel 3.1).

**Tabel 3.1** Kesimpulan perbedaan perlakuan pada koro pedang

Perlakuan	Tingkatan				
	Sterilisasi	Perendaman (6 jam)	Perkecambahan (2hari)	Inkubasi (5 hari)	Jamur
UT	✓				
UG	✓	✓			
G	✓	✓	✓	✓ (tanpa jamur)	
EG	✓	✓	✓	✓ (dengan jamur)	✓

Untuk sampel yang dikecambahkan (G), koro pedang yang telah direndam diletakkan pada wadah plastik steril yang kemudian ditempatkan di germinator yang dimodifikasi. Koro pedang dikecambahkan selama 7 hari pada suhu 25°C dan 100% RH. Untuk sampel yang dikecambahkan dan elisitasi (EG), koro pedang yang telah direndam dikecambahkan selama 2 hari pada suhu 25°C dan 100% RH. Selanjutnya suspensi spora (15 mL/200 g koro pedang) ditambahkan pada koro pedang yang telah dikecambahkan, dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Untuk

sampel yang tidak dikecambahkan (UG), koro pedang hanya direndam dengan air steril saja untuk dijadikan kontrol.

Koro pedang yang berkecambah dan tidak berkecambah dipisahkan dan dihitung persen perkecambahannya. Kemudian seluruh sampel dengan perlakuan yang berbeda dikeringkan dengan menggunakan oven selama 12 jam dengan suhu 40°C hingga kadar air sekitar 10%. Koro pedang berkecambah yang sudah kering digiling dengan menggunakan *ball miller* dengan rasio *ball to sample* 20:1. Koro pedang hasil penggilingan *ball miller* selanjutnya disaring dengan saringan berukuran 100 mesh. Hasil penyaringan bubuk koro pedang berkecambah disimpan di *freezer* untuk proses analisis selanjutnya.

### 3.5.3 Tahap Ekstraksi

Metode ekstraksi asam amino non protein pada koro pedang terlebih dahulu dioptimasi menggunakan berbagai pelarut mengacu pada rujukan ekstraksi L-DOPA dikarenakan senyawa L-DOPA paling banyak dianalisis dan terdapat dalam koro pedang (Thaakur, 2007) yaitu dengan pelarut HCl 0,1 N (Siddhuraju & Becker, 2001), pelarut etanol 1:1 yang diasamkan (Sardjono *et al.*, 2016), pelarut metanol 1:1 (Vachhani *et al.*, 2011.), dan pelarut asetonitril 1:1 yang diasamkan (Hasegawa *et al.*, 2011). Sampel bubuk koro pedang sebanyak 200 mg diekstraksi dengan menggunakan *ultrasonic vibrator* selama 30 menit pada suhu ruang. Dengan penggunaan ultrasonik proses ekstraksi senyawa organik pada tanaman dan biji-bijian dengan menggunakan pelarut organik dapat berlangsung lebih cepat. Dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Mason, 1990). Ekstrak kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Residu diekstraksi kembali sebanyak 3 kali menggunakan masing-masing pelarut dan metode yang kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrometer UV pada panjang gelombang 280 nm. Optimasi pengulangan ekstraksi dilakukan untuk



mengetahui berapa kali ekstraksi yang dibutuhkan hingga senyawa asam amino non protein terekstrak secara optimal. Ekstraksi dikatakan sudah optimal apabila absorbansi sudah mencapai 10% dari absorbansi awal.

Setelah diketahui pelarut yang cocok untuk ekstraksi asam amino non protein (pelarut metanol 1:1), sampel bubuk koro pedang sebanyak 200 mg dihilangkan lemaknya terlebih dahulu dengan menggunakan n-heksan sebanyak 20 mL, kemudian dikeringkan. Bubuk koro pedang yang telah dihilangkan lemaknya diekstraksi dengan 20 mL metanol:air (1:1) menggunakan *ultrasonic vibrator* selama 30 menit pada suhu ruang.

Supernatan yang diperoleh sebanyak 60 ml diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* sampai kering. Ekstrak dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex* selama 2 menit lalu disimpan di *freezer* untuk analisis lebih lanjut.

#### 3.5.4 Tahap Anaisis dengan HPLC/UV

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Hitachi D-7000 digunakan untuk menentukan kandungan asam amino non protein dari ekstrak koro pedang. Metode yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Sardjono, Musthapa, & Subarnas (2016) dengan beberapa modifikasi. Analisis dilakukan pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan kolom fasa terbalik C18. Fasa gerak terdiri dari air, metanol dan asam fosfat pH 2,5 dengan perbandingan 82:17:1, elusi isokratik dan laju aliran 1 mL / menit pada suhu 27°C.

#### 3.5.5 Tahap Analisis dengan UPLC-ESI-QTOF

Analisis senyawa asam amino non protein dilakukan dengan menggunakan instrumen UPLC-ESI-QTOF Xevo ToF-1, yang terdiri dari bagian *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang dihubungkan dengan spektroskopi massa resolusi tinggi dengan teknik ionisasi *Electron Spray Ionization* (ESI) dan penganalisis massa *Quadrupole Time-of-Flight* (Q-TOF) dalam mode positif. Kolom yang

digunakan adalah C-18 ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 VanGuard™ Pra-Kolom 3 / Pk (2.1x5 mm). Metode yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Kite & Ireland (2002) dengan beberapa modifikasi. Fasa gerak terdiri dari 0,02% asam format dalam air pH 2,2 (A) dan metanol (B) dengan laju aliran 1 ml/menit. Elusi gradien linear sebagai berikut: 0 menit, 0% pelarut B; 5 menit, 0% pelarut B; 25 menit, 50% pelarut B; 30 menit, 50% pelarut B; 35 menit, 0% pelarut B. Volume sampel adalah 7,5 µL Mode operasi untuk spektroskopi massa adalah ESI (+); tegangan kapiler: 3,0 KV; tegangan kerucut: 60 V; *low collision energy* (CE): 6,0 V; kisaran akuisisi: 100-1000 Da.